

## 坛紫菜核糖体蛋白 *S15a* 基因的克隆及高温胁迫表达分析

梅高尚, 纪德华, 李 兵, 徐 燕, 陈昌生, 谢潮添\*

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 坛紫菜栽培中经常遭遇高温胁迫危害而产生烂菜现象, 为研究坛紫菜在高温胁迫条件下的分子应答机制, 分离并克隆高温胁迫应答的相关基因, 应用引物退火控制(ACP)技术对耐高温型纯系 Z-61 叶状体在高温胁迫条件下的差异表达基因进行筛选时, 获得一条在高温胁迫条件下表达水平显著降低的基因片段, 通过 5'-RACE 技术获得了它的全长, 命名为 *Phrps15a*(GenBank 登录号: JN991055.1)。该基因序列全长 676 bp, 包含一个 390 bp 的开放阅读框编码 130 个氨基酸的核糖体 S15a 蛋白(PhRPS15a), 蛋白分子式为  $C_{664}H_{1066}N_{188}O_{180}S_7$ , 由 3 条螺旋、7 个片层及 8 个环状连接组成, 与多个物种的 RPS15a 蛋白具有较高的序列一致性(78%~80%)。系统进化分析表明, 动物、高等植物、绿藻和坛紫菜 PhRPS15a 蛋白均享有独立的进化分支, 但坛紫菜 PhRPS15a 蛋白与团藻和莱茵衣藻的亲缘关系更近。实时荧光定量 PCR 分析结果表明, *Phrps15a* 基因的表达水平与高温胁迫密切相关, 在高温胁迫条件下, *Phrps15a* 基因的表达水平极显著下调。

**关键词:** 坛紫菜; 引物退火控制技术; 核糖体蛋白 S15a; 高温胁迫; 克隆; 表达

**中图分类号:** Q 785; S 917.3

**文献标志码:** A

坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)是我国特有的暖温带性种类, 原产于福建沿海潮间带的岩礁上, 自 20 世纪 60 年代全人工栽培取得成功以来, 坛紫菜栽培迅速发展, 目前已经成为我国南方沿海的主要养殖品种之一, 其产量约占全国紫菜总产量的 80%, 创造了可观的经济效益<sup>[1]</sup>。

坛紫菜生长的适宜水温为 15~26 °C, 每年 9 月份海水水温降至 26 °C 以下时, 就可以采壳孢子上网, 开始紫菜的栽培过程。网帘下海 10~15 d 后, 紫菜初见苗, 如果此时水温低于 25 °C, 且逐渐下降, 就对幼苗的生长有利。如果小潮遇上持续南风、高温、风平浪静的天气, 水温上升就很容易造成幼苗烂苗和脱苗现象, 严重影响坛紫菜的后续生长。长期以来, 由于对坛紫菜良种选育工作相对滞后, 很多紫菜养殖户连续多年自养自留, 每年随意从

人工栽培海区取一些紫菜作为种菜, 没有经过严格的筛选, 造成近亲繁殖, 种质严重退化; 再加上养殖户为使紫菜提早上市, 壳孢子采苗的季节愈来愈早, 而南方海区每年 9—10 月份很容易出现持续高温的闷热天气, 近年来, 已多次发生高温导致坛紫菜幼苗烂苗或成菜烂菜、减产的事件, 严重威胁着坛紫菜栽培业的持续发展<sup>[2]</sup>。因此, 研究坛紫菜高温胁迫应答的分子机制, 分离并克隆高温胁迫应答相关基因, 对于指导后续耐高温品种的选育, 保证坛紫菜栽培业的可持续健康发展具有重要意义。

引物退火控制(annealing control primer, ACP)技术是一种在 DDRT-PCR(mRNA 差异显示技术)基础上发展起来的筛选差异表达基因的新方法<sup>[3]</sup>, 该方法能够很好地消除起始反应的非特异性, 具

收稿日期: 2012-04-19 修回日期: 2012-09-05

资助项目: 国家自然科学基金项目(41176151); 国家“八六三”高技术研究发展计划(2012AA100811); 公益性行业(农业)科研专项(200903030); 海洋公益性行业科研专项(201105008, 201105023); 福建省杰出青年基金项目(2010J06016); 福建省教育厅新世纪优秀人才项目(JA10186); 福建省科技重大专项(2011NZ0001)

通讯作者: 谢潮添, E-mail: ctxie@jmu.edu.cn

有假阳性低、重复性好、PCR 产物分布范围广泛、速度快且成本低廉等优点<sup>[3-4]</sup>, 已在哺乳动物和水生动物发育和抗病相关差异表达基因的克隆中得到了广泛应用<sup>[5-8]</sup>, 谢潮添等<sup>[9]</sup>也采用该技术在坛紫菜中克隆得到了一条高温胁迫应答相关的基因 *Phrps7*。因此, 本实验拟采用 ACP 技术继续对坛紫菜高温胁迫条件下的差异表达基因进行筛选, 并进行差异表达基因的全长克隆和应答高温胁迫不同时间水平的表达定量分析, 以期丰富坛紫菜高温胁迫应答相关的基因资源, 为进一步分析坛紫菜的高温胁迫应答机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 坛紫菜样品及高温胁迫处理

供试材料为人工杂交选育获得的耐高温品系 Z-61 的 F<sub>4</sub> 叶状体<sup>[6]</sup>, 取自福建省坛紫菜种质资源库。

将坛紫菜藻体在正常条件下[温度(21±0.5) °C,

光照 2 000~3 000 lx, 昼夜光周期 12 h:12 h, 每 3 天更换一次培养液]培养至(15±2) cm 时, 选取叶面平滑、色深有光泽、无斑点烂洞的完整藻体置于(30±0.5) °C 的恒温光照培养箱中进行高温胁迫处理(其余培养条件同正常条件)6 h 后作为实验组, 以正常温度下培养的藻体为对照组分别提取总 RNA, 并逆转录为 cDNA 后用于高温胁迫差异表达基因的筛选。

同时, 另取一组(15±2) cm 的完整藻体置于(30±0.5) °C 的恒温光照培养箱中分别进行高温胁迫处理(其余培养条件同正常条件)0、3、6、9、12 和 24 h 后, 提取总 RNA, 用于基因表达水平的实时荧光定量 PCR 分析。每个处理组设置 3 个平行。

### 1.2 引物及其序列

ACP 筛选差异表达基因片段、5'-RACE 扩增、全长基因 head to toe 验证和基因表达水平定量分析所用引物序列如表 1 所示, 由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 实验中所用引物的名称和序列  
Tab. 1 Name and sequence of primers in this experiment

引物名称 primer	引物序列(5'-3') primer sequence	
ACP	dT-RSL	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
	RSL2	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTIIIIAGGCGATGCC
	UPM-L	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
	UPM-S	CTAATACGACTCACTATAGGGC
RACE	NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
	GSP	CCCAGTTCTCCACCTGTCTACC
	NGSP	GCCAATGTAGCCGTGCTTCTG
head to toe	rsp15F	TCCCTCGTCCCGCTTTCCT
	rsp15R	GAGGGAGCCGAATGTGGGTAT
	rsp15qF	TGCAGAAGCACGGCTACATT
qPCR	rsp15qR	AGTTCTCCACCTGTCTACCTTG
	18SF	AATGTCGACAGGGCAAGTCTGGTGAA
	18SR	AACCCGGGCTCCATTAGAGTCTCTGAAG

### 1.3 总 RNA 的分离纯化

收集坛紫菜藻体 0.1 g, 经滤纸吸干和液氮研磨后, 采用 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒(艾德莱生物技术有限公司, 北京)提取各样品的总 RNA。

### 1.4 差异表达基因筛选与克隆

逆转录合成 cDNA 第一条链 分别在两个 0.5 mL 的 PCR 管中加入如下反应组分: 1~3 μg 总

RNA, 10 μmol/L dT-RSL 引物 2 μL, 加无 RNA 酶双蒸水至总体积 12 μL, 混合均匀后 70 °C 孵育 2 min, 再在冰上冷却 2 min。接着向两个 PCR 管中分别继续加入如下反应组分: 5×RT Buffer 4 μL, 10 mmol/L dNTP 1 μL, 20 mmol/L DTT 2 μL, 200 U/μL 逆转录酶 1 μL, 混合均匀后 42 °C 孵育 90 min, 再 94 °C 变性 2 min。合成的对照组和实验组的 cDNA 第一条链分别用无 DNA 酶双蒸水稀释相应倍数后, 放

置于-20℃冰箱中备用。

ACP 技术筛选差异表达基因 分别在两个 0.5 mL 的 PCR 管中, 加入 20  $\mu$ L 如下反应体系: 10  $\times$  PCR Buffer 2  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 0.4  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L dT-RSL 1  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L RSL2 随机引物 1  $\mu$ L, 5 U/ $\mu$ L Taq DNA 聚合酶 0.1  $\mu$ L, cDNA(对照组或实验组)1  $\mu$ L, 加双蒸水至总体积 20  $\mu$ L。PCR 扩增程序为 94℃ 预变性 5 min, 50℃ 3 min, 72℃ 2 min, 1 个循环; 94℃ 40 s, 65℃ 40 s, 72℃ 40 s, 35 个循环; 72℃ 5 min。PCR 扩增后, 分别取对照组或实验组扩增产物 7  $\mu$ L, 采用 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

目的片段切胶回收、转化及测序 采用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(中科瑞泰生物科技有限公司, 北京)回收差异表达片段。将回收产物同 PMD-18T 载体(TaKaRa)连接后转化至感受态细胞 *E. coli* DH5 $\alpha$  中, 经蓝白斑筛选和 M13 引物阳性克隆验证后, 将阳性克隆扩大培养, 并采用 MiniBEST Plasmid Purification 试剂盒提取质粒 DNA(TaKaRa, 大连)后送往大连宝生物工程有限公司测序。

### 1.5 差异表达基因的全长克隆

由于 ACP 技术筛选获得的差异表达基因片段均含完整的 3'-polyA 结构, 因此只需根据测序获得的差异表达基因片段序列设计 5' 端引物进行 5'-RACE 扩增, 即可获得该差异表达基因的全长序列。

采用 Primer Premier 5.0 软件设计获得差异表达基因 5'-RACE 特异性扩增引物(GSP)和巢式引物(NGSP)。首先按照 SMART RACE cDNA Amplification Kit (clontech)的操作说明取 1  $\mu$ g 总 RNA 用于 5'-RACE cDNA 第一链的合成, 然后将合成后获得的 10  $\mu$ L 体系用 Tricine-EDTA Buffer 稀释至 100  $\mu$ L 备用。

5'-RACE 反应体系为 5'-RACE cDNA 2.5  $\mu$ L, 10 $\times$ advantage PCR Buffer 5  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 1  $\mu$ L, 50 $\times$  advantage polymerase mix 1  $\mu$ L, 引物 GSP (10  $\mu$ mol/L)1  $\mu$ L, UPM (10 $\times$ , 试剂盒自带引物) 5  $\mu$ L, 最后补充 PCR-grade water 至总体积为 50  $\mu$ L。PCR 扩增程序为 94℃ 30 s, 72℃ 3 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 70℃ 3 min, 5 个循环; 94℃ 30 s, 68℃ 3 min, 72℃ 3 min, 27 个循环; 4℃ 10 min。将首轮 PCR 产物稀释 50 倍后取 5  $\mu$ L 进行第二轮扩增,

第二轮扩增反应体系为首轮 PCR 扩增产物稀释 50 倍的产物 5  $\mu$ L, 10 $\times$ advantage PCR Buffer 5  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 1  $\mu$ L, 50 $\times$  advantage polymerase mix 1  $\mu$ L, 引物 NGSP(10  $\mu$ mol/L)1  $\mu$ L, 引物 NUP (10 $\times$ , 试剂盒自带引物) 5  $\mu$ L, 最后补充 PCR-grade water 至总体积为 50  $\mu$ L。PCR 扩增程序同第一轮, 只将最后一步 27 个循环改成 15 个循环。扩增产物用 1.2%的琼脂糖凝胶电泳分离后, 回收并纯化目的条带。

目的片段克隆和测序方法同“1.4”, 将测序获得的序列同“1.4”中的序列通过软件 MEGA 5.03 进行拼接, 获得一条差异表达基因的完整序列。进一步根据拼接成的完整序列设计 head to toe 引物, 再次以逆转录获得的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 以验证拼接序列的正确性和完整性。

### 1.6 差异表达基因 *Phrps15a* 的生物信息学分析

使用 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)软件分析拼接完成后序列的开放阅读框(ORF)和编码氨基酸序列, 采用在线软件进行蛋白质同源性比对、多重序列分析和基因编码蛋白的一、二和三级结构预测分析。并从 GenBank 数据库中选取模式生物人(*Homo sapiens*, NP\_001010.2), 小鼠(*Mus musculus*, P62245.2), 斑马鱼(*Danio rerio*, NP\_997927.1), 果蝇 (*Drosophila melanogaster*, NP\_524709.1), 油菜 (*Brassica napus*, Q00332.3), 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, NP\_172256.1), 小麦 (*Triticum aestivum*, HM055513.1), 莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*, XP\_001700656.1), 团藻 (*Volvox carteri f.Nagariensis*, XP\_002947188.1)9 个物种的核糖体蛋白 S15a 序列, 采用 MEGA 5.03 软件根据除权配对法(unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMAM)构建了 PhRPS15a 蛋白的系统发育树。

### 1.7 坛紫菜 *Phrps15a* 基因表达水平的定量 RT-PCR 分析

根据 *Phrps15a* 基因序列设计定量 PCR 正反向引物 Rsp15qF 和 Rsp15qR, 并以 18S rRNA 引物作为内参, 进行 *Phrps15a* 基因在高温胁迫不同时间水平下相对表达量的实时荧光定量 PCR 分析。

提取的各样品(高温胁迫条件下分别培养 0, 3, 6, 9, 12 和 24 h 的叶状体)总 RNA 按 TaKaRa 公司的 PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent kit 说明书进行操作, 以

Random 6 mers 为引物进行反转录反应。25  $\mu\text{L}$  的反应体系包含: 12.5  $\mu\text{L}$  2 $\times$ SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (TaKaRa), 0.2  $\mu\text{mol/L}$  引物和 2  $\mu\text{L}$  反转录产物。扩增程序为 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 62  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环。循环结束后从 55  $^{\circ}\text{C}$  缓慢升温至 95  $^{\circ}\text{C}$ , 绘制溶解曲线。荧光定量 PCR 扩增在 ABI7300 型定量 PCR 仪上进行。

以 10 $\times$ 梯度稀释的 cDNA 为模板进行定量 PCR 扩增, 制作 *Phrps15a* 基因和内参的标准曲线。每次反应都设置阴性对照和无模板对照, 每个反应设 3 个平行复孔。应用 Excel 和 SPSS 13.0 软件对试验数据进行统计分析, 并采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和最小显著差异法 (LSD) 比较不同数据组间的差异,  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  表示极显著差异。

## 2 结果

### 2.1 差异表达基因筛选和全长克隆

采用 ACP 技术, 在通用引物 dT-RSL 与 20 条 RSL 随机引物组成的 20 对引物组合对坛紫菜叶状体在高温胁迫条件下的差异表达基因进行筛选时, 引物 dT-RSL 与 RSL2 组合在对照组中扩增出了一条长度约为 550 bp 的差异表达基因片段(图 1-a)。

该基因片段经切胶回收和转化克隆后测序, 序列长度为 512 bp, 3'端含有 29 bp 的 polyA 序列。

以此为基础, 采用 5'-RACE 技术进行该基因序列 5' 端的扩增, 得到一条长度约为 420 bp 的特异性片段(图 1-b), 经过克隆、测序并与 3'端序列拼接后得到一条 676 bp 的完整序列。使用 head to toe 引物进行 PCR 扩增, 电泳结果如图 1-c 所示, 割胶回收后再次测序, 结果与拼接获得的完整序列完全一致, 说明拼接的目的片段是差异表达基因的全长序列。

采用 ORF Finder 软件分析发现该全长基因序列从第 148 个碱基开始至第 540 个碱基为完整的开放阅读框(ORF), 其余为非编码序列, 可编码 130 个氨基酸(图 2)。进一步通过 BlastX 软件进行氨基酸序列同源性比对发现该基因编码的蛋白质属于核糖体 S8 蛋白超家族, 与人、小鼠、斑马鱼、果蝇、油菜、拟南芥、小麦、莱茵衣藻和团藻的序列同源性为 78%~80%。图 3 为该基因编码氨基酸序列与其他物种相应蛋白氨基酸序列的多重序列比对结果。由此可以推断所克隆的差异表达基因片段为坛紫菜核糖体蛋白 S15a 基因序列, 命名为 *Phrps15a*。将序列提交至 GenBank 数据库中, 登录号为 JN991055。

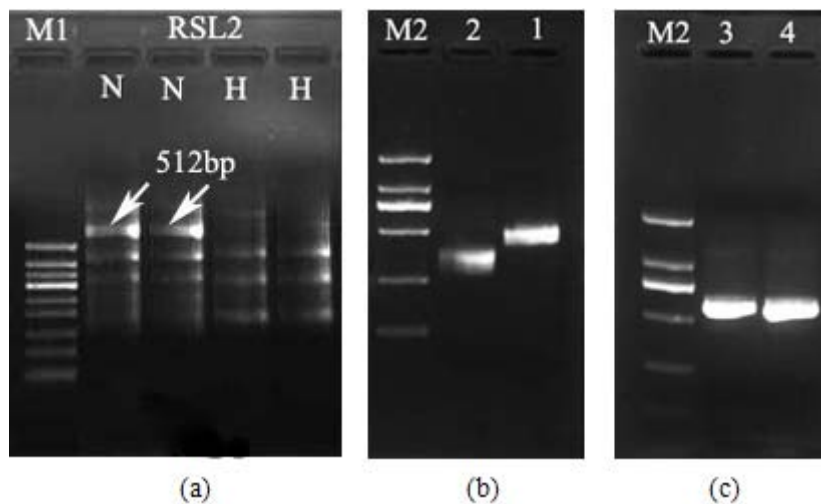


图 1 基因差异表达片段筛选及全长克隆电泳图

(a) 引物 dT-RSL 与 RSL2 组合扩增产物电泳图; (b) 5'-RACE 产物电泳图; (c) 全长序列检测电泳图; M1. 50 bp DNA marker; M2. DL2000 DNA Marker; N. 对照组, H. 实验组; 箭头. 差异表达基因片段; 1. 5'-RACE 第一轮扩增结果; 2. 5'-RACE 第二轮扩增结果; 3,4. 2 个平行实验。

### Fig. 1 Agarose electrophoresis of different expressed gene screening and gene full-length cloning

(a) Agarose electrophoresis of different expressed gene screening; (b) Agarose electrophoresis of gene full-length cloning by 5'-RACE; (c) Agarose electrophoresis of validating of full-length gene; M1. 50 bp DNA marker; M2. DL2000 DNA Marker; N. thalli was cultured under normal temperature; H. thalli was cultured under high temperature for 6 days; Arrow. fragment of differential expression gene; 1. the amplified result of first cycle of 5'-RACE; 2. the amplified result of second cycle of 5'-RACE; 3, 4. two parallel results).

```

1  acatgggggtcctcatcgcgcccttcgacgccaccgcttccccctcc
49  ctcgtcccgcctcttctcgtcaacccctgcctccctgtatttccttgtta
100 tcgtttggtgcgccccgcaccggctgctttgtcgacgtgcggttcgtc
148 atgggtgcgcatgagtgctggggcgatgccctcaagacgctgtcc
    M V R M S V L G D A L K T L S
193 aatgcgggagaagcgggggaagcggcgaggtgatgctgcgggccatcg
    N A E K R G K R Q V M L R P S
238 tccaaagtgggtcatcaagtttctgcagatcatgcagaagcagggc
    S K V V I K F L Q I M Q K H G
283 tacattggcgagtttgagtagcttgaccaccggggcgggcaag
    Y I G E F E Y V D D H R A G K
328 atcgtggtgaacttgatcggggcggtcaacaagtgtggtgtcatc
    I V V N L I G R L N K C G V I
373 tcgccccggttgacgtcaaggtaggacaggtggagaactgggtc
    S P R F D V K V G Q V E N W V
418 aacaacctgctgcccagccgtcagtttgggtacatcatgctcacc
    N N L L P S R Q F G Y I M L T
463 acctcgtagggcatcaggaccacgaggaggcgcgcgccaagcac
    T S Y G I M D H E E A R A K H
508 acgggtggcaagattctgggcttcttctat 540 gcgct
    T G G K I L G F F Y *
546 gcgctgctgctgctgcagattgacccccctgcgtgacacccac
591 ctccttgatatacgggtgatcggccccgtataagaatatacccacat
636 tcggctccctcgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 676

```

图 2 坛紫菜核糖体蛋白 S15a 基因核苷酸序列及预测的氨基酸序列

atg 起始密码子, tag 终止密码子。

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of ribosomal protein S15a of *P.haitanensis*

atg is the initiation codon, tag is the termination codon.

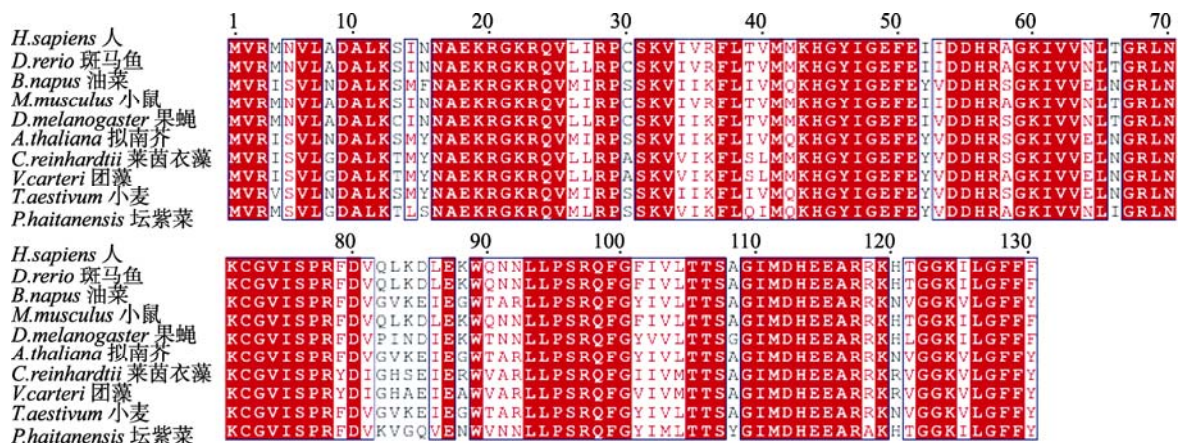


图 3 核糖体蛋白 S15a 氨基酸序列的多重序列比对

Fig. 3 Multiple sequence alignment of ribosomal protein S15a based on amino acid sequences

### 2.2 坛紫菜 *Phrps15a* 基因编码蛋白分析

采用 ExPASy ProtParam 软件分析坛紫菜 *Phrps15a* 基因的编码产物, 该基因编码 130 个氨基酸的蛋白质, 分子式为 C<sub>664</sub>H<sub>1066</sub>N<sub>188</sub>O<sub>180</sub>S<sub>7</sub>, 分子量为 14787.3, 理论等电点为 9.90, 负电荷氨基酸残基(Asp+Glu)总数为 11, 正电荷氨基酸残基(Arg+Lys)总数为 20, 不稳定系数为 28.97, 脂肪系数为 92.85, 总平均疏水度为-0.172, 表明该蛋白质稳定, 亲水性较强, 易溶于水溶液中。利用

PredictProtein 程序预测该蛋白的二级结构中构成螺旋(H)、片层(E)和环状(L)的氨基酸残基占总氨基酸比例分别为 26.92%、33.85%与 39.23%。利用在线软件 Swiss-Model 对坛紫菜 PhRPS15a 氨基酸序列的三级空间结构进行预测(图 4), 该蛋白由 3 条螺旋, 7 个片层及 8 个环状连接组成。

### 2.3 坛紫菜 *Phrps15a* 蛋白的系统进化分析

采用 UPGMAM 法构建了坛紫菜及其它生物进化阶元的部分代表物种 RPS15a 蛋白氨基酸序列

的系统进化树(图 5)。由图可知, 所有的 RPS15a 起源于一个共同的祖先蛋白, 首先进化出 2 个原始分支, 动物和植物分别聚合成一个独立的进化分支。在所选择的植物界物种中, 高等植物、绿藻和坛紫菜分别享有独立的进化分支, 但坛紫菜 RPS15a 蛋白与团藻和莱茵衣藻 RPS15a 蛋白的亲缘关系更近。

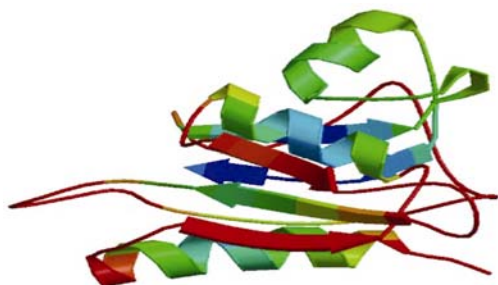


图 4 坛紫菜核糖体蛋白 S15a 的三级结构  
Fig. 4 Three-dimension structure of ribosomal protein S15a of *P. haitanensis*

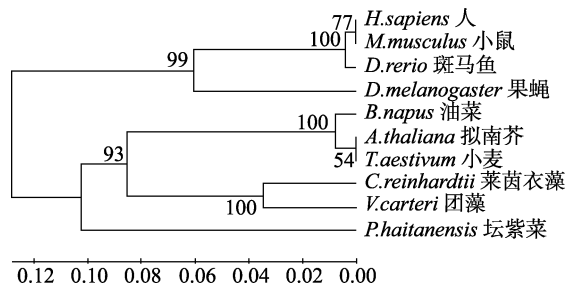


图 5 基于氨基酸序列构建的核糖体蛋白 S15a 系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of ribosomal protein S15a based on amino acid sequence

#### 2.4 坛紫菜 *Phrps15a* 基因表达水平的实时荧光定量 PCR 分析

坛紫菜 *Phrps15a* 基因和内参的实时荧光定量 PCR 扩增曲线基线平整, 指数增长区明显, 斜率大且固定, 溶解曲线显示扩增产物均为单一的特异峰, 阴性对照和无模板对照均无扩增, 3 个平行复孔扩增结果重复性良好, 说明扩增体系和反应条件良好, 无非特异性扩增, 定量结果准确可靠(图 6), *Phrps15a* 基因在高温胁迫各时间水平下的表达水平均要显著低于常温对照。高温胁迫 3 h 时, 即可检测到 *Phrps15a* 基因的表达水平发生极显著的下降 ( $P < 0.01$ ), 胁迫 9 h 时达到最低点, 12 h 以后表达量又有一定的回升, 但仍显著低于胁迫开始前 ( $P < 0.05$ )。定量分析结果与前面 ACP 筛选实验结果一致, 由此推断, *Phrps15a* 基因的表达受到了高温胁迫的抑制。

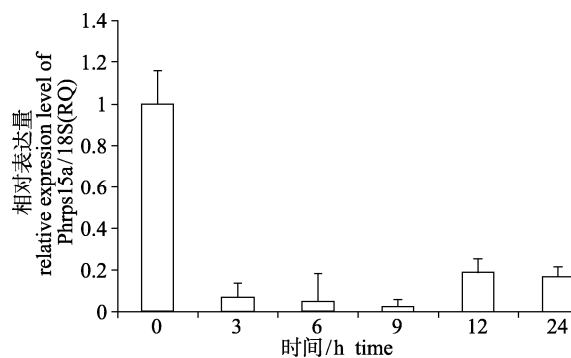


图 6 *Phrps15a* 基因在高温胁迫不同时间水平下的相对表达情况

Fig. 6 Relative expression level of *Phrps15a* gene under high temperature stress with different time

### 3 讨论

植物在长期的生命进化过程中, 通过不断发生的遗传变异和自然选择, 发展出了各种各样的应对环境的适应机制, 当遭受逆境胁迫时, 就会启动一系列的生理响应过程以抵抗环境的胁迫作用, 这一过程是一个庞大且复杂的系统, 包括了无数的调节和反馈机制, 不但涉及大量基因的上调表达, 同时也包含一大批基因的下调表达<sup>[10]</sup>。作为低等植物的藻类也不例外, 王孟强<sup>[11]</sup>利用基因芯片技术研究了条斑紫菜在不同失水水平下的基因表达谱变化, 结果发现在条斑紫菜配子体的失水过程中, 大约有 8.74%~11.09% 的基因上调, 而下调表达基因的数量则在各个阶段变化较大。本研究通过 ACP 技术在高温胁迫培养条件下的坛紫菜耐高温型纯系 Z-61 叶状体中筛选出了一条下调表达的基因片段, 经全长克隆和同源性比对确认其为核糖体蛋白 S15a 基因。

核糖体是生物细胞内最重要的细胞器之一, 主要执行解码 mRNAs, 并与 tRNA 一起合成相应蛋白质的功能。在真核细胞中, 核糖体是由 40S 的小亚基和 80S 大亚基组成, 主要包括 4 种 rRNA 和大约 80 种蛋白质<sup>[12]</sup>。越来越多的证据表明, 核糖体蛋白除组装成核糖体、参与蛋白质生物合成之外, 还具有其他的功能, 如参与 DNA 复制、修复, RNA 的加工以及发育调控等, 核糖体蛋白基因表达异常将影响核糖体的功能<sup>[13]</sup>。核糖体蛋白 S15a(ribosomal protein s15a, RPS15a)是 40S 小亚基的组成成分之一, 它位于细胞质中, 归属于核糖体蛋白 S8P 家族。目前关于 RPS15a 的功能和它与其

他核糖体蛋白或 rRNA 的相互作用还知之甚少。

在动物中, 有研究表明 *RPS15a* 基因参与了肝癌的发生和发展<sup>[14-15]</sup>, Uechi 等<sup>[16]</sup>在斑马鱼的研究中进一步证实了 *RPS15a* 基因就是斑马鱼的癌基因。在植物中, 已有的研究结果均表明, *RPS15a* 基因的表达与细胞的活跃分裂有关, 如 Bonham-Smith 等<sup>[17-18]</sup>、Schaap 等<sup>[19]</sup>、窦红等<sup>[20]</sup>在油菜、双孢菇和连翘中的研究结果均表明, 该基因在分裂组织中的表达水平要显著高于其它组织中的表达水平。此外, 栗现芳等<sup>[21]</sup>对小麦 *RPS15a* 基因的研究发现, 该基因的表达上调可能与小麦多子房性状的发生有关。本实验中, 高温胁迫条件下坛紫菜 *RPS15a* 基因的表达水平显著下降, 可能与坛紫菜对高温胁迫的应答机制相关。高温胁迫条件下, 坛紫菜藻体为了减少高温胁迫对自身的伤害, 抑制 *RPS15a* 基因的合成, 以减缓细胞的分裂速度, 从而减少自身的能量消耗, 以渡过高温胁迫期。这与坛紫菜在高温胁迫条件下培养, 生长速度明显下降的表型变化现象相符, 因为紫菜藻体的生长属于“散生长”, 其个体的生长速度完全取决于细胞的分裂速度。

#### 参考文献:

- [1] Nicolas A B, Juliet A B, Arthur C G, *et al.* *Porphyra*: a marine crop shaped by stress [J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 16: 29–37.
- [2] 张元, 谢潮添, 陈昌生, 等. 高温胁迫下坛紫菜叶状体的生理响应[J]. *水产学报*, 2011, 35(3): 379–386.
- [3] Kim Y J, Kwak C I, Gu Y Y, *et al.* Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels [J]. *Biology Techniques*, 2004, 36: 424–428.
- [4] 谢芳靖, 张子平, 林鹏, 等. 引物退火控制技术在差异表达基因克隆中的应用[J]. *海洋科学*, 2007, 31(5): 70–75.
- [5] Hwang K C, Cui X S, Park S P, *et al.* Identification of differentially regulated genes in bovine blasto-cysts using an annealing control primer system [J]. *Molecular Report*, 2004, 69: 43–51.
- [6] Cui X S, Shin M R, Lee K A, *et al.* Identification of differentially expressed genes in murine embryos at the blastocyst stage using annealing control primer system [J]. *Molecular Report*, 2005, 70: 278–287.
- [7] Lee H Y, Cui X S, Lee K A, *et al.* Annealing control primer system identifies differentially expressed genes in blastocyst stage porcine parthenotes [J]. *Zygote*, 2006, 14: 71–80.
- [8] Xie F J, Zhang ZP, Lin P, *et al.* Identification of immune responsible fibrinogen beta chain in the liver of large yellow croaker using a modified annealing control primer system [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27: 202–209.
- [9] 谢潮添, 张元, 陈昌生, 等. 坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)核糖体蛋白 S7 基因的克隆与表达分析[J]. *水产学报*, 2011, 35(12): 1814–1821.
- [10] Miguel A M, Wolfgang B, Philip N B. Omics meet networks – using systems approaches to infer regulatory networks in plants [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2010, 13: 126–131.
- [11] 王孟强. 条斑紫菜功能基因组特性与抗逆相关基因表达分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
- [12] Wool I G. The structure and function of Eukaryotic ribosomes [J]. *Annual Review Biochemistry*, 1979, 48: 719–754.
- [13] Ramakrishnan V. Ribosome structure and the mechanism of translation [J]. *Cell*, 2002, 108(4): 557–572.
- [14] Lian Z, Liu J, Li L, *et al.* Human S15a expression is upregulated by hepatitis B virus X protein [J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2004, 40(1): 34–46.
- [15] 孟存英, 袁东红, 王映梅, 等. 人核糖体蛋白 S15a 在大肠癌组织中的表达及其意义[J]. *中国医药生物技*, 2007, 2(2): 101–103.
- [16] Uechi T, Nakajima Y, Nakao A, *et al.* Ribosomal protein gene knockdown causes developmental defects in zebrafish [J]. *PLoS ONE*, 2006, 1: e37.
- [17] Bonham-Smith P C, Moloney M M. Nucleotide and protein sequences of a cytoplasmic ribosomal protein S15a gene from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiology*, 1994, 106(1): 401–402.
- [18] Bonham-Smith P C, Oancia T L, Moloney M M. Cytoplasmic ribosomal protein S15a from *Brassica napus*: molecular cloning and developmental expression in mitotically active tissues [J]. *Plant Molecular Biology*, 1992, 18: 909–919.
- [19] Schaap P J, De Groot P W, Müller Y, *et al.* Molecular cloning and sequence of the cytoplasmic ribosomal protein S15a gene from *Agaricus bisporus* [J]. *Experimental Mycology*, 1995, 19(2): 160–162.
- [20] 窦红, 李少刚, 郭小青. 连翘核糖体蛋白 FsRS15 基因的克隆与序列分析[J]. *中国药物与临床*, 2011, 11(1): 42–44.
- [21] 栗现芳, 马守才, 张改生, 等. 小麦核糖体蛋白 S15a 基因(TaRPS15a)的克隆及其在多子房株系中的时空表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2011, 19(2): 236–242.

## Molecular cloning and expression analysis under high temperature stress of ribosomal protein S15a gene from *Porphyra haitanensis*

MEI Gao-shang, JI De-hua, LI Bing, XU Yan, CHEN Chang-sheng, XIE Chao-tian\*

(College of Fisheries, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** *Porphyra haitanensis* is an economically important marine crop in southern China. A major problem in *Porphyra* farming is thallus decay in response to high temperature stress. Molecular studies of temperature stress can help to resolve the issue of thallus decay. In this study, to study the molecular mechanism of high temperature tolerance in *P. haitanensis*, the technology of annealing control primer (ACP) was used to screen the differential expressed genes in gametophytic blades of an F4 high temperature tolerance line Z-61. By the primers combination of dT-RSL and RSL2, one differential expressed gene fragment was cloned. And the full length sequence of this gene fragment was cloned by 5'RACE technology and named as *Phrps15a* (accession number JN991055.1). The *Phrps15a* gene with a 676bp sequences contains an open reading frame of 390 bp encoding a PhRPS15a protein of 130 amino acid residues. The PhRPS15a protein which was assembled by 3 helices, 7 sheets and 8 cycles shared high amino acid sequence identity with RPS15 from other organisms (78%-80%), and its molecular formula was  $C_{664}H_{1066}N_{188}O_{180}S_7$ . Phylogenetic analysis showed that the evolution of PhRPS15a of animal, higher plant, green algae and *P. haitanensis* has unattached evolutionary groups, and the PhRPS15a protein of *P. haitanensis* has closer relation with RPS15a proteins from green alga than ones from other organisms. The results of real-time quantitative PCR indicated that the expressed level of *Phrps15a* has close relation with high temperature stress. Under high temperature stress, the expression of *Phrps15a* gene was down-regulated significantly.

**Key words:** *Porphyra haitanensis*; technology of ACP; ribosomal protein S15a; high temperature stress; cloning; expression

**Corresponding author:** XIE Chao-tian. E-mail: [ctxie@jmu.edu.cn](mailto:ctxie@jmu.edu.cn)